

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局



(43)国際公開日
2002年9月19日 (19.09.2002)

PCT

(10)国際公開番号
WO 02/072839 A1

(51)国際特許分類⁷: C12N 15/53, 9/04, 1/15, 1/19,
1/21, 5/10, C12Q 1/32, G01N 27/327

(71)出願人および
(72)発明者: 早出 広司 (SODE,Koji) [JP/JP]; 〒152-0013 東
京都目黒区南1丁目13番16号 Tokyo (JP).

(21)国際出願番号: PCT/JP02/02124

(72)発明者; および

(22)国際出願日: 2002年3月7日 (07.03.2002)

(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 五十嵐 聰
(IGARASHI,Satoshi) [JP/JP]; 〒184-8569 東京都小金
井市中町2-24-16 東京農工大学内 Tokyo (JP).

(25)国際出願の言語: 日本語

(74)代理人: 田中 玲子, 外 (TANAKA,Reiko et al.); 〒
100-6036 東京都千代田区霞が関3丁目2番5号 霞
が関ビル36階大野総合法律事務所 Tokyo (JP).

(26)国際公開の言語: 日本語

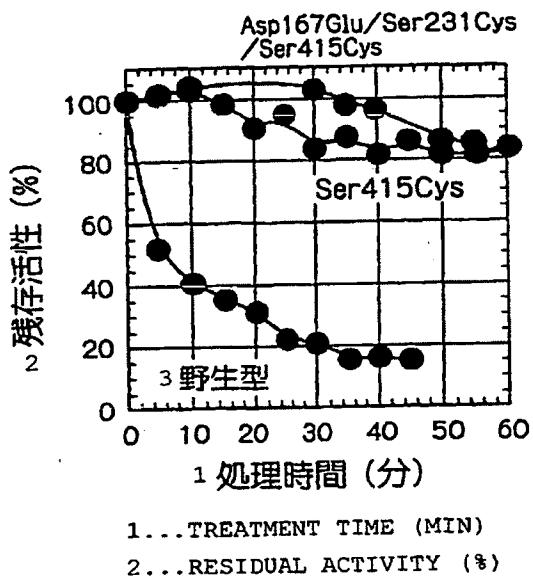
(81)指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,

(30)優先権データ:
特願2001-70413 2001年3月13日 (13.03.2001) JP

[続葉有]

(54)Title: GLUCOSE DEHYDROGENASE

(54)発明の名称: グルコース脱水素酵素



(57)Abstract: A water-soluble PQQGDH, characterized in
that two sub-units are combined with each other via a disul-
fide bonding. The water-soluble PQQGDH exhibits improved
heat stability.

(57)要約:

2つのサブユニットがジスルフィド結合を介して互いに連結されていることを
特徴とする水溶性PQQGDHが開示される。本発明の水溶性PQQGDHは、
改良された熱安定性を有することを特徴とする。

WO 02/072839 A1



DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 國際調査報告書

- (84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

グルコース脱水素酵素

5 技術分野

本発明はピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素（PQQGDH）の製造、およびグルコースの定量におけるその使用に関する。

背景技術

10 血中グルコース濃度は、糖尿病の重要なマーカーである。また、微生物を用いる発酵生産においては、プロセスをモニタリングするためにグルコース濃度を定量する。従来、グルコースはグルコースオキシダーゼ（GOD）あるいはグルコース6リン酸脱水素酵素（G6PDH）を用いる酵素法により定量されていた。
しかし、GODを用いる方法ではグルコース酸化反応にともない発生する過酸化水素を定量するためカタラーゼあるいはパーオキシダーゼをアッセイ系に添加する必要があった。G6PDHは分光学的手法に基づくグルコース定量に用いられてきたが、反応系に補酵素であるNAD（P）を添加しなければならない。

このため、これまでのグルコース酵素定量方法に用いられてきたGODまたはG6PDHにかわる新たな酵素としてPQQGDHの使用が試みられている（特開平10-243786、WO00/66744、WO00/61730）。PQQGDHはグルコースに対して高い酸化活性を有していること、およびPQQGDHは補酵素結合型の酵素であるため電子受容体として酸素を必要としないことから、グルコースセンサーの認識素子として有用である。

25 PQQGDHは、グルコースを酸化してグルコノラクトンを生成する反応を触媒する。PQQGDHには、膜結合性酵素と水溶性酵素がある。膜結合性PQQGDHは、分子量約87kDaのシングルペプチド蛋白質であり、種々のグラム陰性菌において広く見いだされている。水溶性PQQGDHはAcinetobacter calcoaceticusのいくつかの株においてその存在が確認されており（Biosci. Biotech. Biochem. (1995),

- 2 -

59 (8), 1548-1555)、その構造遺伝子がクローニングされアミノ酸配列が明らかにされている (Mol. Gen. Genet. (1989), 217: 430-436)。A. calcoaceticus 由来の水溶性 PQQ-GDH は、同一の 50 kDa のサブユニットから構成されるホモダイマー酵素である。各サブユニットは、1 分子の PQQ および 3 個の Ca⁺⁺を含む。ダイマー蛋白質は、2 つの活性中心を有するが、モノマー酵素は GDH 活性を示さない。したがって、GDH 活性を示すためには、ダイマー構造が形成されることが必須である。また、水溶性 PQQ-GDH の X 線結晶構造解析がおこなわれ、同酵素の高次構造が明らかとなっている (J. Mol. Biol., 289, 319-310 33 (1999), A. Oubrie et al., EMBO Journal, 18 (1999) 5187-5194 (1999), A. Oubrie et al., PNAS, 96 (21), 11787-11791 (1999), A. Oubrie et al.)。

15 本発明は、改良された熱安定性を有する改変型水溶性 PQQ-GDH を提供することを目的とする。

発明の開示

本発明は、2 つのサブユニットが 1 またはそれ以上のジスルフィド結合を介して互いに連結されていることを特徴とする水溶性 PQQ-GDH を提供する。

20 本明細書において「PQQ-GDH」とは、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素を意味する。また、「改変型 PQQ-GDH」とは、天然に存在するグルコース脱水素酵素の構造の一部が化学的に改変されている PQQ-GDH を意味する。かかる改変は、例えば、酵素蛋白質の 1 またはそれ以上のアミノ酸残基を他の天然のまたは天然に存在しないアミノ酸残基で置換することにより、あるいは 1 またはそれ以上のアミノ酸を欠失させるかまたは付加することにより行うことができる。なお、本明細書においては、PQQ-GDH のアミノ酸の位置は、開始メチオニンを 1 として番号付けする。したがって、配列番号 1 に示される最初のアミノ酸残基 Asp は 25 番目のアミノ酸残基である。

本明細書において、「ジスルフィド結合」とは、-S-S-結合を意味する。

また、「サブユニット」とは、ダイマーを構成する各モノマーサブユニットをいう。

好ましくは、本発明の水溶性PQQGDHは、天然に存在するPQQGDHの、
1 またはそれ以上のシステイン以外のアミノ酸残基がシステイン残基で置換され
5 ている。また好ましくは、本発明の水溶性PQQGDHは、Acinetobacter calcoaceticus 由来である。

本発明のPQQGDHの特に好ましい態様においては、配列番号1で表される
アミノ酸配列の415番目のセリン残基がシステイン残基で置換されており、2
つのサブユニット上のそれぞれのシステイン残基間にジスルフィド結合が形成さ
10 れている。

また別の好ましい態様においては、配列番号1で表されるアミノ酸配列の41
4番目のチロシン残基がシステイン残基で置換されており、2つのサブユニット
上のそれぞれのシステイン残基間にジスルフィド結合が形成されている。

また別の好ましい態様においては、配列番号1で表されるアミノ酸配列の34
15 0番目のアスパラギン酸残基および418番目のチロシン残基が、両方ともシス
テイン残基で置換されており、2つのサブユニット上のそれぞれのシステイン残
基間にジスルフィド結合が形成されている。

本発明のPQQGDHの特に好ましい態様においては、本発明のPQQGDH
は、配列：

20 Pro Thr Tyr Cys Thr Thr Tyr

を含む。

また別の好ましい態様においては、本発明のPQQGDHは、配列：

Pro Thr Cys Cys Thr Thr Tyr

を含む。

25 また別の好ましい態様においては、本発明のPQQGDHは、配列：

Thr Gly Lys Asn Phe Val Pro および Ser Thr Thr Tyr Asp Asp Ala

を含む。

本発明はまた、本発明のPQQGDHをコードする遺伝子、該遺伝子を含むベ
クターおよび該遺伝子を含む形質転換体、ならびに本発明のPQQGDHを含む

グルコースアッセイキットおよびグルコースセンサーを提供する。

本発明の改変型 PQQGDH の酵素蛋白質は高い熱安定性を有し、かつグルコースに対して高い酸化活性を有していることから、グルコースの高感度かつ高選択的な測定に応用できる。特に、酵素生産において調製／精製時の失活が少なく 5 収率が高い、溶液中での安定性が高く酵素の保存が容易である、本酵素を用いてアッセイキットあるいは酵素センサーを作成する過程において失活が少なく、本酵素を用いて作成されたアッセイキットあるいは酵素センサーの熱安定性が高いことから、保存性に優れるといった利点が期待される。

10 図面の簡単な説明

図 1 は、本発明において用いたプラスミド pGB2 の構造を示す。

図 2 は、本発明の改変型酵素をコードする構造遺伝子を作成する方法を示す。

図 3 は、本発明の改変型酵素の熱安定性を示す。

図 4 は、本発明の改変型酵素の熱安定性を示す。

15 図 5 は、本発明の改変型 PQQGDH を用いるグルコースのアッセイを示す。

図 6 は、本発明の改変型酵素の熱安定性を示す。

図 7 は、本発明の改変型酵素の熱安定性を示す。

発明を実施するための最良の形態

20 改変型 PQQGDH の構造

本発明の PQQGDH は、ホモダイマー構造において、2つのサブユニットが 1 またはそれ以上のジスルフィド結合を介して連結されており、このことにより、高い熱安定性を示すことを特徴とする。このような連結構造は、ダイマー構造の各モノマーの界面で互いに近接する位置に配置される 1 またはそれ以上のアミノ酸残基をシステイン残基に置き換えて、サブユニット間にジスルフィド結合を形成させることにより構築することができる。

水溶性 PQQGDH は、配列番号 1 に規定されるアミノ酸配列を有し、X 線結晶構造解析に基づいてその高次構造が明らかにされている (J. Mol. Biol., 289, 319-333 (1999), EMBO Journal, 18

(19) 5187-5194 (1999)。この推定高次構造にしたがえば、
ダイマー酵素が構築されたときに、両方のモノマー上のSer415がモノマー
界面上で互いに近接する位置に配置される。Ser415をCysに置換して、
モノマー間にジスルフィド結合を形成させたところ、野生型と比較して非常に高
い熱安定性を有する改変型酵素を得ることができた。

これは、ジスルフィド結合の形成により、水溶性PQQGDHダイマーの4次
構造の安定性が増大したためであると考えられる。このことは、架橋化学修飾
(特開2000-262281) またはテザー構造の構築(特開2001-37
483)を用いてダイマー構造を安定化させることによりPQQGDHの熱安定
性が増大するというこれまでの知見とも一致する。

さらに、本発明においては、PQQGDH-Bのダイマー界面で向き合う位置
にあり、かつそれらの側鎖間距離が短いAsn340およびThr418を両方
ともCysに置換してモノマー間に2か所のジスルフィド結合を形成させること
により、野生型と比較して非常に高い熱安定性を有する改変型酵素を得ることが
できた。

当業者は、本発明の教示および酵素の推定高次構造に関する情報に基づいて、
ダイマー構造において各モノマーの界面で互いに近接する位置に配置されるアミ
ノ酸残基を予測し、この残基をシスティンで置換することにより、熱安定性の向
上した改変型グルコース脱水素酵素を得ることができる。置換すべきアミノ酸残
基は、各モノマーの同じ位置に存在しなくてもよい。すなわち、各モノマーの界
面において一方のモノマー上の第1のアミノ酸残基と他方のモノマー上の第2の
アミノ酸残基とが近接する位置に配置される場合、これらの第1および第2のア
ミノ酸残基とともにシスティン残基に置換することができる。この場合には、2
か所でジスルフィド結合が形成される。同様にして、3か所以上のジスルフィド
結合を有するダイマー構造を構築することも可能である。

本発明の改変型グルコース脱水素酵素においては、グルコースデヒドロゲナー
ゼ活性を有する限り、さらに他のアミノ酸残基の一部が欠失または置換されてい
てもよく、また他のアミノ酸残基が付加されていてもよい。そのようなアミノ酸
残基の欠失、置換、付加のための種々の方法が当該技術分野において知られてお

り、例えば、Sambrook ら、" Molecular Cloning; A Laboratory Manual"、第2版、1989、Cold Spring Harbor Laboratory Press、New York に記載されている。当業者は、本明細書の教示にしたがって、そのようなアミノ酸残基の欠失、置換、付加を含むグルコース脱水素酵素が所望のグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有しているか否かを容易に試験することができる。例えば、水溶性PQQGDHの特定の位置のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基で置換することにより、基質であるグルコースに対する親和性を改良しうることが報告されている（特開2000-31258、特開2000-350588）。

さらに、当業者は、他の生物に由来する水溶性PQQGDHについても、その三次元構造を予測し解析することにより、本発明の教示にしたがって2つのモナマーの界面に位置するアミノ酸残基を予測し、これらの残基をシステイン残基に置換してジスルフィド結合を形成させることにより、熱安定性の向上した改変型グルコース脱水素酵素を得ることができる。特に、蛋白質の一次構造、二次構造または三次構造を比較することにより、Acinetobacter calc 15 oaceticus 由来の水溶性PQQGDHの415番目のセリン残基または414番目のチロシン残基に相当するアミノ酸残基、または340番目のアスパラギン酸残基および418番目のチロシン残基の組み合わせに相当するアミノ酸残基の組み合わせを容易に理解することができ、本発明にしたがって、かかる残基をシステイン残基で置換して改変型グルコース脱水素酵素を得ることができる。20 これらの改変型グルコース脱水素酵素も本発明の範囲内である。

改変型PQQGDHの製造方法

Acinetobacter calc oaceticus 由来の天然の水溶性PQQGDHをコードする遺伝子の配列は配列番号2で規定される。

本発明の改変型PQQGDHをコードする遺伝子は、天然の水溶性PQQGDHをコードする遺伝子において、目的とするアミノ酸残基をコードする塩基配列を、システイン残基をコードする塩基配列に置換することにより構築することができる。このような部位特異的塩基配列置換のための種々の方法が当該技術分野において知られており、例えば、Sambrook ら、" Molecular Cloning; A Laboratory Manual"、第2版、1989、Cold Spring Harbor Laboratory Press、

New York に記載されている。このようにして得た変異遺伝子を遺伝子発現用のベクター（例えばプラスミド）に挿入し、これを適当な宿主（例えば大腸菌）に形質転換する。外来性蛋白質を発現させるための多くのベクター・宿主系が当該技術分野において知られており、宿主としては例えば、細菌、酵母、培養細胞など
5 の種々のものを用いることができる。

水溶性 PQQGDH は大腸菌において発現させたときにペリプラズム空間に分泌されるため、菌体そのものを用いて容易に酵素活性の検定を行うことができる。
得られた形質転換体を 60-70°C で約 30 分処理した後に、グルコースおよび
10 色素として PMS-DCIP を加え、残存する PQQGDH の活性を目視により判定して、熱処理によっても残存活性を示すクローニングを選択し、遺伝子配列を解析してその変異を確認する。

上述のようにして得られた、改変型 PQQGDH を発現する形質転換体を培養し、培養液から遠心分離などで菌体を回収した後、菌体をフレンチプレスなどで破碎するか、またはオスモティックショックによりペリプラズム酵素を培地中に放出させる。これを超遠心分離し、PQQGDH を含む水溶性画分を得ることができる。あるいは、適当な宿主ベクター系を用いることにより、発現した PQQGDH を培養液中に分泌させることもできる。得られた水溶性画分を、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー、HPLC などにより精製することにより、本発明の改変型 PQQGDH を調製する。
15

20 酵素活性の測定方法

本発明の PQQGDH は、PQQ を補酵素として、グルコースを酸化してグルコノラクトンを生成する反応を触媒する作用を有する。

酵素活性の測定は、PQQGDH によるグルコースの酸化にともなって還元される PQQ の量を酸化還元色素の呈色反応により定量することができる。呈色試薬としては、例えば、PMS (フェナジンメトサルフェート) -DCIP (2, 25 6-ジクロロフェノールインドフェノール)、フェリシアン化カリウム、フェロセンなどを用いることができる。

熱安定性

本発明の改変型 PQQGDH の熱安定性は、酵素を高温（例えば 55°C）でイ

ンキュベートし、一定時間ごとにアリコートを取り出して酵素活性を測定し、時間経過にともなう酵素活性の低下をモニターすることにより評価することができる。典型的には、酵素の熱安定性は、熱失活半減期、すなわち酵素活性が 50 % に減少するまでに要する時間 ($t_{1/2}$) を指標として表される。あるいは、熱安定性は、酵素を所定温度で所定時間処理した後の酵素活性の残存率(熱処理前の活性に対する熱処理後の活性の比)で表すことができる。

本発明の改変型 PQQGDH は、野生型 PQQGDH と比較して高い熱安定性を有することを特徴とする。このため、酵素生産において調製／精製時の失活が少なく収率が高い、溶液中での安定性が高く酵素の保存が容易である、本酵素を用いてアッセイキットあるいは酵素センサーを作成する過程において失活が少なく、本酵素を用いて作成されたアッセイキットあるいは酵素センサーの熱安定性が高いことから、保存性に優れるなどの利点を有する。

グルコースアッセイキット

本発明はまた、本発明に従う改変型 PQQGDH を含むグルコースアッセイキットを特徴とする。本発明のグルコースアッセイキットは、本発明に従う改変型 PQQGDH を少なくとも 1 回のアッセイに十分な量で含む。典型的には、キットは、本発明の改変型 PQQGDH に加えて、アッセイに必要な緩衝液、メディエーター、キャリプレーションカーブ作製のためのグルコース標準溶液、ならびに使用の指針を含む。本発明に従う改変型 PQQGDH は種々の形態で、例えば、凍結乾燥された試薬として、または適切な保存溶液中の溶液として提供することができる。好ましくは本発明の改変型 PQQGDH はホロ化した形態で提供されるが、アポ酵素の形態で提供し、使用時にホロ化することもできる。

グルコースセンサー

本発明はまた、本発明に従う改変型 PQQGDH を用いるグルコースセンサーを特徴とする。電極としては、カーボン電極、金電極、白金電極などを用い、この電極上に本発明の酵素を固定化する。固定化方法としては、架橋試薬を用いる方法、高分子マトリックス中に封入する方法、透析膜で被覆する方法、光架橋性ポリマー、導電性ポリマー、酸化還元ポリマーなどがあり、あるいはフェロセンあるいはその誘導体に代表される電子メディエーターとともにポリマー中に固定

あるいは電極上に吸着固定してもよく、またこれらを組み合わせて用いてもよい。好ましくは本発明の改変型PQQGDHはホロ化した形態で電極上に固定化するが、アポ酵素の形態で固定化し、PQQを別の層としてまたは溶液中で提供することもできる。典型的には、グルタルアルデヒドを用いて本発明の改変型PQQGDHをカーボン電極上に固定化した後、アミン基を有する試薬で処理してグルタルアルデヒドをプロッキングする。

グルコース濃度の測定は、以下のようにして行うことができる。恒温セルに緩衝液を入れ、PQQおよびCaCl₂、およびメディエーターを加えて一定温度に維持する。メディエーターとしては、フェリシアン化カリウム、フェナジンメトサルフェートなどを用いることができる。作用電極として本発明の改変型PQQGDHを固定化した電極を用い、対極（例えば白金電極）および参照電極（例えばAg/AgCl電極）を用いる。カーボン電極に一定の電圧を印加して、電流が定常になった後、グルコースを含む試料を加えて電流の増加を測定する。標準濃度のグルコース溶液により作製したキャリブレーションカーブに従い、試料中のグルコース濃度を計算することができる。

本明細書において明示的に引用される全ての特許および参考文献の内容は全て引用により本明細書に取り込まれるものとする。また、本出願が有する優先権主張の基礎となる出願である日本特許出願第2001-70413号の明細書に記載の内容は全て本明細書の一部としてここに引用する。

20

実施例

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されることはない。

実施例1

25 改変型PQQGDHをコードする遺伝子の構築

配列番号2に示されるAcinetobacter calcoaceticus由来PQQGDHの構造遺伝子をもとに、常法に従って部位特異的変異法によりアミノ酸残基を置換した。部位特異的変異はベクターpTrc99A（ファルマシア社製）のマルチクローニング部位に、Acinetobacter calcoaceticus由来PQQGDHをコードする構

造遺伝子を挿入したプラスミド p GB 2 (図 1) を用いて、図 2 に示す方法により行った。変異に用いた合成オリゴヌクレオチドターゲットプライマーの配列を以下に示す。

Ser415Cys	catcataaggtagtgcaataagttggatc
5 Tyr414Cys/Ser415Cys	catcataaggtagtgcaacaagggtggatctaac
Asp167Gly	aggtgatgatttctcatgctgtga
Ser231Lys	cctttgaaattttccatcaagatthaagc

ベクタープラスミド p KF 18 k (宝酒造(株)) に *Acinetobacter calcoaceticus* 由来 PQQGDH をコードする遺伝子の一部を含む *Kpn I-Hind III* 断片を組み込み、これをテンプレートとした。このテンプレート 50 fmol と宝酒造(株) 製 Mutan Express Km キットに付属のセレクションプライマー 5 pmol、リン酸化したターゲットプライマー 50 pmol を全体 (20 μl) の 1/10 量の同キットのアニーリングバッファーとともに混合し、100°C、3 分間の熱処理でプラスミドを変性させ、1 本鎖にした。セレクションプライマーは p KF 18 k のカナマイシン耐性遺伝子上にある二重のアンバー変異を復帰させるためのものである。これを 5 分間氷上に置き、プライマーをアニーリングさせた。これに 3 μl の同キットエクステンションバッファー、1 μl の T4 DNA リガーゼ、1 μl の T4 DNA ポリメラーゼおよび 5 μl の滅菌水を加えて相補鎖を合成した。

20 これを DNA のミスマッチ修復能欠損株である *E. coli* BMH 71-18 mutS に形質転換し、一晩振とう培養を行ってプラスミドを増幅させた。

次に、ここから抽出したプラスミドを *E. coli* MV 1184 に形質転換し、そのコロニーからプラスミドを抽出した。そしてこれらのプラスミドについてシーケンスを行い、目的とした変異の導入を確認した。この断片を、プラスミド p GB 2 上の野生型 PQQGDH をコードする遺伝子の *Kpn I-Hind III* 断片に入れ替え、改変型 PQQGDH の遺伝子を構築した。2 か所以上に変異を導入する場合には、上述の工程を繰り返した。このようにして、Ser415Cys、Tyr414Cys/Ser415Cys、および Asp167Gly/Ser231Lys/Ser415Cys の 3 つの変異体をコードする遺伝子を作成した。

実施例2

改変型酵素の調製

野生型または改変型PQQGDHをコードする遺伝子を、E. coli用の発現ベクターであるpTrc99A（ファルマシア社）のマルチクローニングサイトに挿入し、構築されたプラスミドをE. coli DH5 α 株に形質転換した。これを450mlのL培地（アンピシリン50 μ g/ml、クロラムフェニコール30 μ g/ml含有）で坂口フラスコを用いて37℃で一晩振とう培養し、1mM CaCl₂、500 μ M PQQを含む7lのL培地に植菌した。培養開始後約3時間でイソプロピルチオガラクトシドを終濃度0.3mMになるように添加し、その後1.5時間培養した。培養液から遠心分離（5000×g、10分、4℃）で菌体を回収し、この菌体を0.85%NaCl溶液で2回洗浄した。集菌した菌体をフレンチプレスで破碎し、遠心分離（10000×g、15分、4℃）で未破碎の菌体を除去した。上清を超遠心分離（160500×g（40000r.p.m.）、90分、4℃）し、水溶性画分を得た。

次に、こうして得た水溶性画分を10mMリン酸緩衝液pH7.0で一晩透析した。透析したサンプルを10mMリン酸緩衝液pH7.0で平衡化した陽イオン交換クロマトグラフィー用充填カラムTSKgel CM-TOYOPEARL 650M（東ソー株式会社）に吸着させた。このカラムを10mMリン酸緩衝液pH7.0、750mlで洗浄した後、0-0.2M NaClを含む10mMリン酸緩衝液pH7.0を用い、酵素を溶出させた。流速は5ml/minで行った。GDH活性を有する画分を回収し、10mM MOPS-NaOH緩衝液（pH7.0）で一晩透析した。このようにして電気泳動的に均一な改変型PQQGDH蛋白質を得た。これを精製酵素標品として以下の実施例において用いた。

実施例3

ジスルフィド結合形成の確認

実施例2で得られたSer415Cys改変型酵素を、メルカプトエタノール非存在下で熱変性処理し、SDS-PAGE分析を行ったところ、100kDaに主バンド、および50kDaにわずかの量のバンドが認められた。このことから、サブ

ユニット間にジスルフィドが形成されていることが確認された。

実施例 4

酵素活性の測定

酵素活性の測定は 10 mM MOPS-NaOH 緩衝液 (pH 7.0) 中において PMS (フェナジンメトサルフェート) - DCIP (2,6-ジクロロフェノールインドフェノール) を用い、DCIP の 600 nm の吸光度変化を分光光度計を用いて追跡し、その吸光度の減少速度を酵素の反応速度とした。このとき、1 分間に 1 μmol の DCIP が還元される酵素活性を 1 ユニットとした。また、DCIP の pH 7.0 におけるモル吸光係数は 16.3 mM⁻¹とした。

実施例 5

熱安定性の評価

実施例 2 で得られた野生型酵素および各改変型酵素を、1 μM PQQ、1 mM CaCl₂ 存在下で 1 時間以上ホロ化した後、55°C でインキュベートした。一定時間ごとにアリコートを取り出し、氷上で急冷した。これらのサンプルの酵素活性を実施例 4 の方法に従って測定した。結果を図 3 に示す。

Ser415Cys 改変型酵素および Asp167Gly/Ser231Lys/Ser415Cys 改変型酵素はいずれも、野生型酵素と比較して 55°C における活性の低下が非常に少なかった。Ser415Cys/Tyr414Cys 改変型酵素は、55°C における熱処理により、10 分間で初期活性の 50% まで低下したが、その後約 50 分間、50% の残存活性が保たれた。半減期、すなわち活性が 50% に低下するのに要する時間 ($t_{1/2}$) を計算したところ、野生型の精製酵素、Ser415Cys 改変型酵素および Asp167Gly/Ser231Lys/Ser415Cys 改変型酵素の熱失活の半減期は、それぞれ、14 分、183 分および 136 分であった。

次に、本発明の酵素の温度特性を測定した。実施例 2 で得られた野生型酵素および Ser415Cys 改変型酵素の精製酵素標品をそれぞれ 1 μM PQQ、1 mM CaCl₂、10 mM MOPS 緩衝液 (pH 7.0) 中で、指示された温度で 10 分間インキュベートした後、氷上で急冷した。これらの試料の酵素活性を実施例 4 の方法に従って測定し、熱処理前の活性に対する残存活性として表した。

結果を図4に示す。野生型酵素が60℃における熱処理により活性が50%以下に低下したのに対し、Ser415Cys 改変型酵素は、70℃においても90%の残存活性を示した。

すなわち、本発明の改変型PQQGDHは、野生型PQQGDHと比較して高い熱安定性を有することが確認された。
5

実施例6

酵素活性の評価

実施例2で得られた野生型およびSer415Cys 改変型酵素を、それぞれ1μM PQQ、1mM CaCl₂存在下で1時間以上ホロ化した。これを187μlずつ分注し、3μlの活性試薬（6mMDCIP 48μl, 600mM PMS 8μl, 10mMリン酸緩衝液pH 7.0 16μl）および各濃度のD-グルコース溶液10μlを加え、実施例4に示す方法により室温で酵素活性を測定した。基質濃度対酵素活性のプロットから、K_mおよびV_{max}を求めた。Ser415Cys 改変型酵素のグルコースに対するK_m値は約16mMであり、k_{cat}は346
15 1sec⁻¹であった。一方、野生型のK_m値は、約27mM, k_{cat}は3436 sec⁻¹であった。この結果から、Ser415Cys 改変型酵素は、野生型PQQGDHに匹敵する高い活性を有する酵素であることがわかる。

実施例7

基質特異性の評価

実施例2で得られた野生型、Ser415Cys 改変型酵素およびAsp167Gly/Ser231Lys/Ser415Cys 改変型酵素について基質特異性を調べた。基質として、それぞれ20mMのグルコース、アロース、3-O-メチル-D-グルコース、ガラクトース、ラクトースおよびマルトースを用い、1μM PQQおよび1mM CaCl₂の存在下で30分間インキュベートして、実施例4に示す方法により酵素活性を測定した。値はグルコースを基質としたときの活性に対する相対活性で表した。表1に示されるように、本発明の改変型酵素、Ser415Cys は野生型酵素と同様の基質特異性を示した。また、Ser415Cys に置換され、かつSer231Lys およびAsp167Gluに置換されている変異酵素はAsp167Gluの置換により野生型酵素よりもグルコースに

対して基質特異性が高くなっている。

表 1

	野生型		Ser415Cys		Asp167Glu/Ser231Lys/Ser415Cys		
	Km(mM)	kcat(s ⁻¹)	Km(mM)	kcat(s ⁻¹)	Km(mM)	kcat(s ⁻¹)	
5	グルコース	27	3436	16	3461	53	1248
	アロース	36	2509	21	3664	89	301
	3-O-m-グルコース	29	3011	26	5823	127	412
	ガラクトース	5	232	7	337	165	240
	ラクトース	19	1659	20	2973	31	507
	マルトース	26	1930	11	2477	102	590

実施例 8

10 グルコースのアッセイ

改変型 PQQGDH を用いてグルコースをアッセイした。Ser415Cys 改変型酵素を、 $1 \mu\text{M}$ PQQ、 1mM CaCl_2 存在下で 1 時間以上ホロ化し、各種濃度のグルコースおよび $5 \mu\text{M}$ PQQ、 10mM CaCl_2 存在下で酵素活性を測定した。方法は実施例 4 に記載の酵素活性の測定法に準じ、DCIP の 600 nm の吸光度の変化を指標とした。図 5 に示されるように、Ser415Cys 改変型 PQQGDH を用いて、 5mM – 50mM の範囲でグルコースの定量を行うことができた。

実施例 9

酵素センサーの作製および評価

20 5 U の Ser415Cys 改変型酵素にカーボンペースト 20mg を加えて凍結乾燥させた。これをよく混合した後、既にカーボンペーストが約 40mg 充填されたカーボンペースト電極の表面だけに充填し、濾紙上で研磨した。この電極を 1 % のグルタルアルデヒドを含む 10mM MOPS 緩衝液 (pH 7.0) 中で室温で 30 分間処理した後、 20mM リジンを含む 10mM MOPS 緩衝液 (pH 7.0) 中で室温で 20 分間処理してグルタルアルデヒドをブロックングした。この電極を 10mM MOPS 緩衝液 (pH 7.0) 中で室温で 1 時間以上平衡化させた。電極は 4°C で保存した。

作製した酵素センサーを用いてグルコース濃度の測定を行った。本発明の改変型 PQQGDH を固定化した酵素センサーを用いて、 1mM – 12mM の範囲で

グルコースの定量を行うことができた。

実施例 1 0

Asn340Cys/Tyr418Cys 改変型酵素の調製

P Q Q G D H - B の構造を、Oubrie らの報告 (Oubrie A, et al., (1999) J.

- 5 Mol. Biol. 289: 5187-5194; Oubrie A, et al., (1999) EMBO J. 18: 5187-5159;
Oubrie A, et al., Biochemistry 96: 11787-11791) に基づいて、分子モデル可視化ソフト R a s M o l で表示したところ、P Q Q G D H - B のダイマー界面に位置する 4 CD ループ中の A s n 3 4 0 と 5 CD ループ中の T y r 4 1 8 とが向き合う位置にあり、それらの側鎖間距離が 4 Å 以下であったことから、これらのアミノ酸残基をシステインに置換すればジスルフィド結合が形成される可能性があると考えられた。

実施例 1 に記載の方法にしたがって、部位特異的変異法により P Q Q G D H をコードする遺伝子中に Asn340Cys/Tyr418Cys 変異を導入した。用いたプライマーは次のとおりである。

- 15 Asn340Cys gggacaaaagcatttaccagtcc
Tyr418Cys catcggtacagcgtcatcacaaggtagtgtgc

実施例 2 に記載の方法にしたがって、この改変型酵素の精製酵素標品を調製した。非変性 S D S - P A G E 分析により、1 0 0 k D a 付近にバンドが認められ、サブユニット間にジスルフィドが形成されていることが確認された。

実施例 1 1

Asn340Cys/Tyr418Cys 改変型酵素の活性、熱安定性および基質特異性の評価

- 実施例 1 0 で調製した Asn340Cys/Tyr418Cys 改変型酵素の酵素活性を実施例 4 と同様に測定したところ、野生型の活性値は 3 3 4 7 U / m g であり、改変型酵素の活性値は 2 8 7 7 U / m g であった。また各基質濃度から求めた活性値をもとに算出した K m 値は 1 8 m M であり、野生型と同じであった。また、グルコース、ラクトース、2-デオキシグルコース、マルトース、アロース、3-O-メチル-D-グルコース、ガラクトース、キシロース、マンノースを基質として用いて基質特異性を評価したところ、基質特異性のパターンは野生型と同様であった。

次に、熱安定性を評価するために、熱処理温度を 55℃に固定した状態で 0、
5、10、20、45、60、90、120、150、180 分間、精製酵素標品を処理し、活性の経時変化を測定した。このとき野生型酵素の熱処理は 60 分までとした。結果を図 6 に示す。ここでは、熱処理時間 0 分の活性値を 100 % として各処理時間後の活性が比活性で表されている。図からわかるように、野生型酵素の半減期は 10 分以下であると考えられ、60 分で完全に失活したが、
5 Asn340Cys/Tyr418Cys 改変型酵素では半減期が 60 分以上であり、180 分のインキュベート後でも 20 % の残存活性を示した。また詳細に半減期を求めるために、その比活性の自然対数を時間に対してプロットして残存活性が 50 % となる時間を求めたところ、野生型酵素の半減期はおよそ 10 分であるのに対し、
10 Asn340Cys/Tyr418Cys 改変型酵素の半減期は 70 分であった。

さらに、20℃から 80℃までの各温度で 10 分間熱処理した後の活性を測定した。結果を図 7 に示す。ここでは、20℃のときの活性値を 100 % として残存活性が表されている。野生型では 50℃から 60℃にかけて失活が見られ、50℃では 80 % ほど保っていた残存活性も、60℃になると 10 %、70℃では 0 % となった。それに対し Asn340Cys/Tyr418Cys 改変型酵素では、50℃ではほぼ 100 %、60℃でも 80 % と高い残存活性を保ち、野生型が完全に失活した 70℃でも 20 % の残存活性を示した。

すなわち、Asn340Cys/Tyr418Cys 改変型酵素は野生型酵素と比較して高い熱安定性を有していた。

産業上の利用性

本発明の改変型水溶性 PQQGDH は、グルコースセンサーの認識素子として有用である。

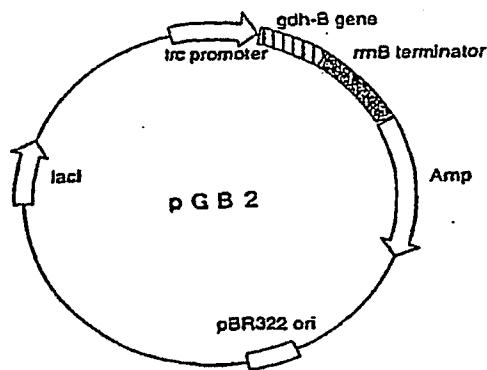
請求の範囲

1. 2つのサブユニットが1またはそれ以上のジスルフィド結合を介して互いに連結されていることを特徴とする水溶性PQQGDH。
- 5 2. 天然に存在するPQQGDHの、1またはそれ以上のシステイン以外のアミノ酸残基がシステイン残基で置換されている、請求項1記載のPQQGDH。
3. 前記PQQGDHが、*Acinetobacter calcoaceticus*由来である、請求項1記載のPQQGDH。
4. 配列番号1で表されるアミノ酸配列の415番目のセリン残基が、システイン残基で置換されている、請求項3記載のPQQGDH。
- 10 5. 配列番号1で表されるアミノ酸配列の414番目のチロシン残基が、システイン残基で置換されている、請求項3記載のPQQGDH。
6. 配列番号1で表されるアミノ酸配列の414番目のチロシン残基および415番目のセリン残基が、両方ともシステイン残基で置換されている、請求項3記載のPQQGDH。
- 15 7. 配列番号1で表されるアミノ酸配列の340番目のアスパラギン酸残基および418番目のチロシン残基が、両方ともシステイン残基で置換されている、請求項3記載のPQQGDH。
8. 配列：
20 Pro Thr Tyr Cys Thr Thr Tyr
を含む水溶性PQQGDH。
9. 配列：
Pro Thr Cys Cys Thr Thr Tyr
を含む水溶性PQQGDH。
- 25 10. 配列：
Thr Gly Lys Asn Phe Val Pro および Ser Thr Thr Tyr Asp Asp Ala を含む水溶性PQQGDH。
 11. 請求項1-10のいずれかに記載のPQQGDHをコードする遺伝子。
 12. 請求項11に記載の遺伝子を含むベクター。

- 1 3. 請求項 1 1 に記載の遺伝子を含む形質転換体。
 - 1 4. 遺伝子が主染色体に組み込まれている、請求項 1 3 記載の形質転換体。
 - 1 5. 請求項 1 – 1 0 のいずれかに記載の P Q Q G D H を含むグルコースアッセイキット。
- 5 1 6. 請求項 1 – 1 0 のいずれかに記載の P Q Q G D H を含むグルコースセンター。

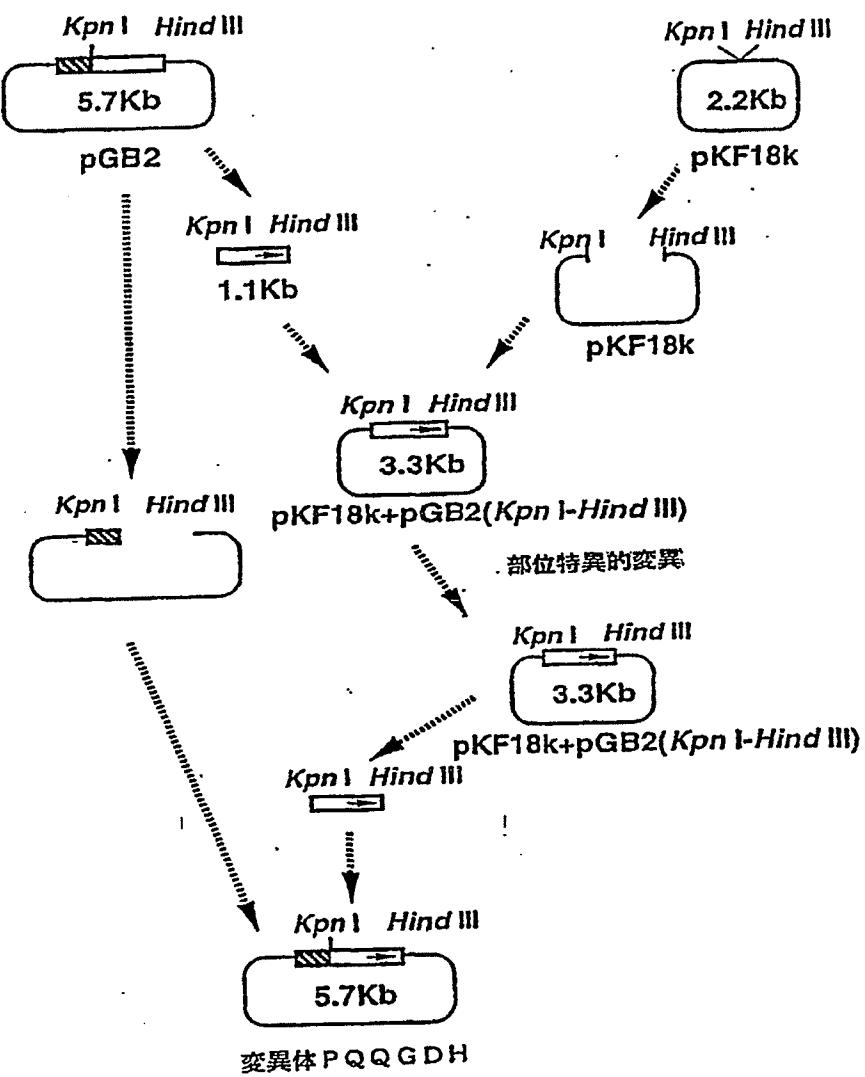
1 / 5

図 1



2 / 5

図 2



3 / 5

図 3

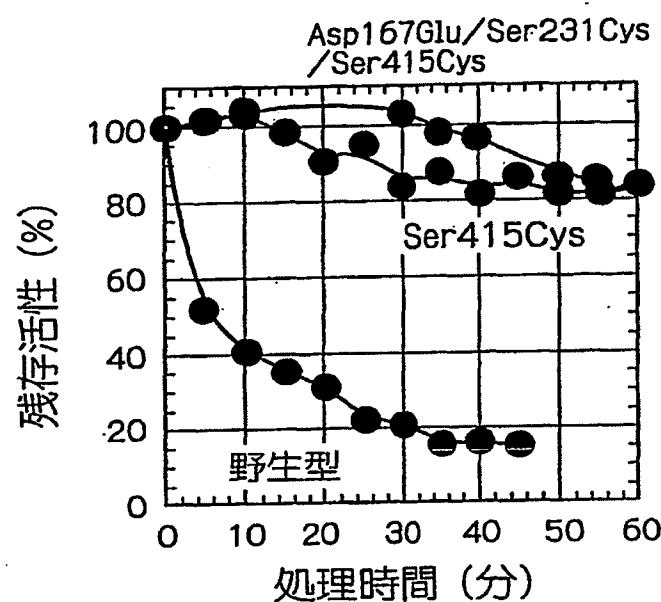
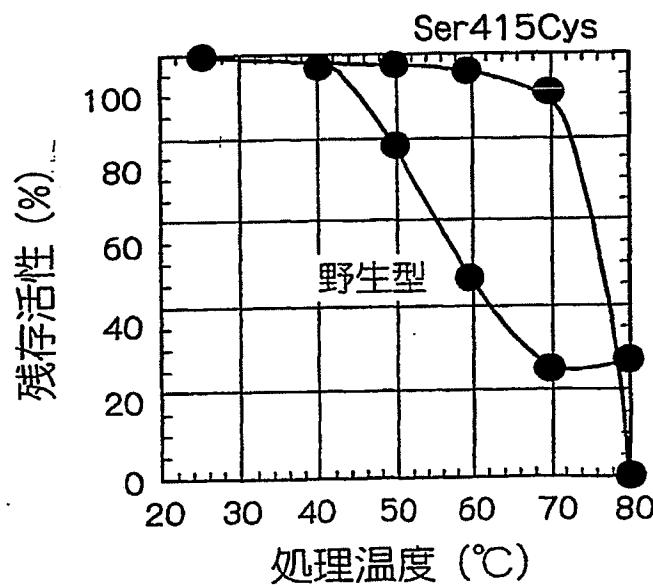
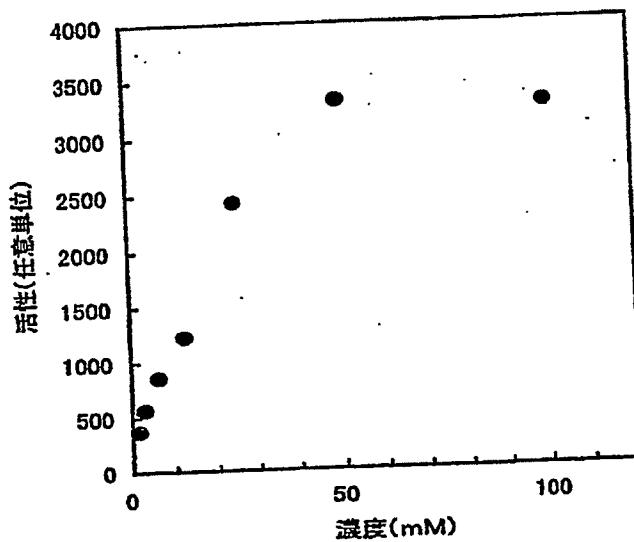


図 4



4 / 5

図 5



5 / 5

図 6

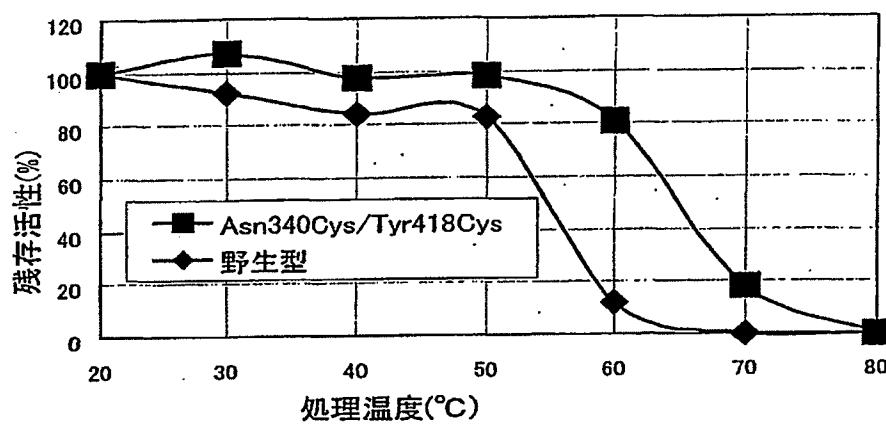
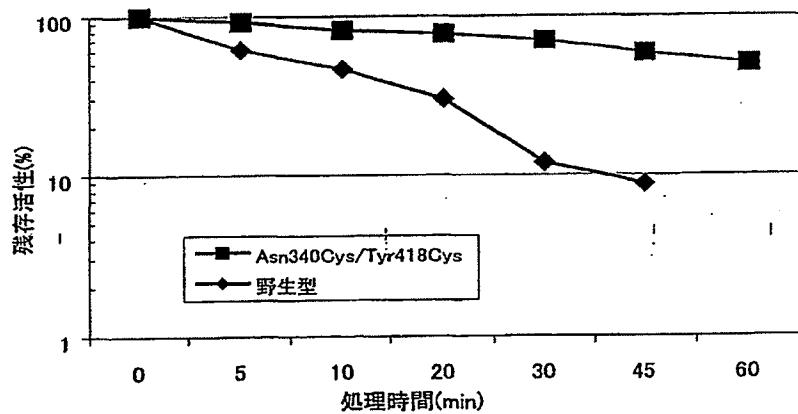


図 7



Sequence Listing

<110> Sode, Koji et al.

<120> Glucose Dehydrogenase

5 <130> PSD-9004W0

<150> JP 2001-70413

<151> 2001-03-13

<160> 8

<210> 1

10 <211> 454

<212> PRT

<213> Acinetobacter calcoaceticus

<400> 1

Asp Val Pro Leu Thr Pro Ser Gln Phe Ala Lys Ala Lys Ser Glu Asn

15 1 5 10 15

Phe Asp Lys Lys Val Ile Leu Ser Asn Leu Asn Lys Pro His Ala Leu

20 20 25 30

Leu Trp Gly Pro Asp Asn Gln Ile Trp Leu Thr Glu Arg Ala Thr Gly

35 35 40 45

20 Lys Ile Leu Arg Val Asn Pro Glu Ser Gly Ser Val Lys Thr Val Phe

50 50 55 60

Gln Val Pro Glu Ile Val Asn Asp Ala Asp Gly Gln Asn Gly Leu Leu

65 65 70 75 80

Gly Phe Ala Phe His Pro Asp Phe Lys Asn Asn Pro Tyr Ile Tyr Ile

25 85 90 95

Ser Gly Thr Phe Lys Asn Pro Lys Ser Thr Asp Lys Glu Leu Pro Asn

100 100 105 110

Gln Thr Ile Ile Arg Arg Tyr Thr Tyr Asn Lys Ser Thr Asp Thr Leu

115 115 120 125

Glu Lys Pro Val Asp Leu Leu Ala Gly Leu Pro Ser Ser Lys Asp His
130 135 140
Gln Ser Gly Arg Leu Val Ile Gly Pro Asp Gln Lys Ile Tyr Tyr Thr
145 150 155 160
5 Ile Gly Asp Gln Gly Arg Asn Gln Leu Ala Tyr Leu Phe Leu Pro Asn
165 170 175
Gln Ala Gln His Thr Pro Thr Gln Gln Glu Leu Asn Gly Lys Asp Tyr
180 185 190
His Thr Tyr Met Gly Lys Val Leu Arg Leu Asn Leu Asp Gly Ser Ile
10 195 200 205
Pro Lys Asp Asn Pro Ser Phe Asn Gly Val Val Ser His Ile Tyr Thr
210 215 220
Leu Gly His Arg Asn Pro Gln Gly Leu Ala Phe Thr Pro Asn Gly Lys
225 230 235 240
15 Leu Leu Gln Ser Glu Gln Gly Pro Asn Ser Asp Asp Glu Ile Asn Leu
245 250 255
Ile Val Lys Gly Gly Asn Tyr Gly Trp Pro Asn Val Ala Gly Tyr Lys
260 265 270
Asp Asp Ser Gly Tyr Ala Tyr Ala Asn Tyr Ser Ala Ala Asn Lys
20 275 280 285
Ser Ile Lys Asp Leu Ala Gln Asn Gly Val Lys Val Ala Ala Gly Val
290 295 300
Pro Val Thr Lys Glu Ser Glu Trp Thr Gly Lys Asn Phe Val Pro Pro
305 310 315 320
25 Leu Lys Thr Leu Tyr Thr Val Gln Asp Thr Tyr Asn Tyr Asn Asp Pro
325 330 335
Thr Cys Gly Glu Met Thr Tyr Ile Cys Trp Pro Thr Val Ala Pro Ser
340 345 350
Ser Ala Tyr Val Tyr Lys Gly Gly Lys Lys Ala Ile Thr Gly Trp Glu

355 360 365
Asn Thr Leu Leu Val Pro Ser Leu Lys Arg Gly Val Ile Phe Arg Ile
370 375 380
Lys Leu Asp Pro Thr Tyr Ser Thr Thr Tyr Asp Asp Ala Val Pro Met
5 385 390 395 400
Phe Lys Ser Asn Asn Arg Tyr Arg Asp Val Ile Ala Ser Pro Asp Gly
 405 410 415
Asn Val Leu Tyr Val Leu Thr Asp Thr Ala Gly Asn Val Gln Lys Asp
 420 425 430
10 Asp Gly Ser Val Thr Asn Thr Leu Glu Asn Pro Gly Ser Leu Ile Lys
 435 440 445
Phe Thr Tyr Lys Ala Lys
 450

15 <210> 2
<211> 1612
<212> DNA
<213> Acinetobacter calcoaceticus
<400> 2
20 agctactittt atgcaacaga gcctttcaga aatttagatt ttaatagatt cgttattcat 60
cataatacaa atcatataga gaactcgtagc aaacccttta tttagaggttt aaaaattctc 120
ggaaaatttt gacaatttt aaggtggaca catgaataaa catttattgg ctaaaattgc 180
tttattaagc gctgttcagc tagttacact cttagcattt gctgatgttc ctctaactcc 240
atctcaattt gctaaagcga aatcagagaa ctttgacaag aaagtatttc tatctaattct 300
25 aaataagccg catgctttgt tatggggacc agataatcaa atttggtaa ctgagcgagc 360
aacaggttaag attctaagag ttaatccaga gtccggtagt gtaaaaaacag ttttcaggt 420
accagagatt gtcaatgtatg ctgatggca gaatggttta tttaggttttgc cttccatcc 480
tgatTTTaaa aataatcctt atatctatat ttccaggtaca tttaaaaatc cgaaatctac 540
agataaaagaa ttaccgaacc aaacgattat tcgtcgttat acctataata aatcaacaga 600

tacgctcgag aagccagtcg attatttagc aggattacct tcataaaaag accatcagtc 660
aggtcgtctt gtcattggc cagatcaaaa gatttattat acgattggtg accaaggcg 720
taaccagctt gcttatttgt tctgccaaa tcaagcacaa catacgccaa ctcaacaaga 780
actgaatggt aaagactatc acacctatat gggtaaagta ctacgcttaa atcttgatgg 840
5 aagtattcca aaggataatc caagtttaa cgggtgggt agccatattt atacacttgg 900
acatcgtaat ccgcagggct tagcattcac tccaaatggt aaattattgc agtctgaaca 960
aggccaaac tctgacgatg aaattaacct cattgtcaaa ggtggcaatt atggttggcc 1020
gaatgttagca ggttataaaag atgatagtgg ctatgcitatt gcaaattatt cagcagcagc 1080
caataagtca attaaggatt tagtcaaaa tggagtaaaa gtacccgcag gggccctgt 1140
10 gacgaaagaa tctgaatgga ctggtaaaaaa ctttgtccca ccattaaaaa ctttatatac 1200
cgttcaagat acctacaact ataacgatcc aacttgtgga gagatgacct acatttgctg 1260
gccaacagtt gcaccgtcat ctgcctatgt ctataagggc ggtaaaaaaag caattactgg 1320
ttggaaaaat acattattgg ttccatctt aaaacgtggt gtcattttcc gtattaagtt 1380
agatccaaact tatagcacta cttatgtatcg cgctgtaccg atgtttaaga gcaacaaccg 1440
15 ttatcgatgt gtgattgcaa gtccagatgg gaatgtctt tatgtattaa ctgatactgc 1500
cgaaaaatgtc caaaaagatg atggctcagt aacaaataca ttagaaaacc caggatctct 1560
cattaaggcc acctataagg ctaagtaata cagtcgcatt aaaaaaccga tc 1612

<210> 3
20 <211> 7
<212> PRT
<213> *Acinetobacter calcoaceticus*
<400> 3
Pro Thr Tyr Cys Thr Thr Tyr

25 1 5

<210> 4
<211> 7
<212> PRT

<213> Acinetobacter calcoaceticus

<400> 4

Pro Thr Cys Ser Thr Thr Tyr

1

5

5

<210> 5

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10 <220>

<223> primer for point mutation

<400> 5

catcataagt agtgcaataa gttggatc

15 <210> 6

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

20 <223> primer for point mutation

<400> 6

catcataagt agtgcaacaa gttggatcta ac

<210> 7

25 <211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 7

aggtgatgtat ttctcatgct gtga

<210> 8

5 <211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

10 <400> 8

ccttggaaat tttccatca agatttaaagc

<210> 9

<211> 7

15 <212> PRT

<213> Acinetobacter calcoaceticus

<400> 9

Thr Gly Lys Asn Phe Val Pro

1

5

20

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> Acinetobacter calcoaceticus

25 <400> 10

Ser Thr Thr Tyr Asp Asp Ala

1

5

<210> 11

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

5 <223> primer for point mutation

<400> 11

gggacaaagc atttaccagt cc

<210> 12

10 <211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

15 <400> 12

catcggtaca gcgtcatcac aagttagtgc

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP02/02124

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/53, C12N9/04, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10,
C12Q1/32, G01N27/327

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/53, C12N9/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE, BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JICST FILE (JOIS)
SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	IGARASHI S. et al., Construction and characterization of mutant water-soluble PPQ glucose dehydrogenases with altered K(m) values-site-directed mutagenesis studies on the putative active site., Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999, Vol.264, No.3, pages 820 to 824	1-16
Y	VELANKER S. S. et al., Disulfide engineering at the dimmer interface of Lactobacillus casei thymidylate synthase: Crystal structure of the T155C/E188C/C244T mutant., Protein Science 1990, Vol.8, pages 930-033	1-16
A	MANSFELD J. et al., Extreme stabilization of a thermolysin-like protease by an engineered disulfide bond., J. Biol. Chem. 1997, Vol.272, No.17, pages 11152 to 11156	1-16

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&"	document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search 24 May, 2002 (24.05.02)	Date of mailing of the international search report 11 June, 2002 (11.06.02)
--	--

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/02124

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	OUNBRIE A. et al., The 1.7Å crystal structure of the apo form of the soluble quinoprotein glucose dehydrogenase from <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> reveals a novel internal conserved sequence repeat., <i>J. Mol. Biol.</i> 1999, Vol.289, pages 319 to 333	1-16
A	OUNBRIE A. et al., Structure and mechanism of soluble quinoprotein glucose dehydrogenase., <i>The EMBO Journal</i> 1999, Vol.18, No.19, pages 5187 to 5194	1-16

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. C1, C12N15/53, C12N9/04, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12Q1/32, G01N27/327		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. C1, C12N15/53, C12N9/04		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) MEDLINE, BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), JICSTファイル(JOIS) SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	IGARASHI S. et al., Construction and characterization of mutant water-soluble PPQ glucose dehydrogenases with altered K(m) values—site-directed mutagenesis studies on the putative active site., Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999, Vol. 264, No. 3, pages 820-824	1-16
Y	VELANKER S.S. et al., Disulfide engineering at the dimer interface of Lactobacillus casei thymidylate synthase: Crystal structure of the T155C/E188C/C244T mutant., Protein Science 1990, Vol. 8, pages 930-033	1-16
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)</p> <p>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p> <p>の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献</p>		
国際調査を完了した日 24. 05. 02	国際調査報告の発送日 11.06.02	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 坂崎 恵美子 印	4N 3037
	電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
A	MANSFELD J. et al., Extreme stabilization of a thermolysin-like protease by an engineered disulfide bond., J. Biol. Chem. 1997, Vol. 272, No. 17, pages 11152-11156	1-16
A	OURBIE A. et al., The 1.7 Å crystal structure of the apo form of the soluble quinoprotein glucose dehydrogenase from Acinetobacter calcoaceticus reveals a novel internal conserved sequence repeat., J. Mol. Biol. 1999, Vol. 289, pages 319-333	1-16
A	OURBIE A. et al., Structure and mechanism of soluble quinoprotein glucose dehydrogenase., The EMBO Journal 1999, Vol. 18, No. 19, pages 5187-5194	1-16

L1 ANSWER 3 OF 3 WPIINDEX COPYRIGHT 2004 THOMSON DERWENT on STN
AN 2002-723360 [78] WPIINDEX
DNN N2002-570312 DNC C2002-204849
TI Acinetobacter calcoaceticus-originated water-soluble pyroquinoline-quinone glucose dehydrogenase with two subunits combined through disulfide bond, applicable in glucose sensors for determining serum glucose.
DC B04 D16 S03
IN IGARASHI, S; SODE, K
PA (SODE-I) SODE K
CYC 101
PI WO 2002072839 A1 20020919 (200278)* JA 36 C12N015-53 <--
RW: AT BE CH CY DE DK EA ES FI FR GB GH GM GR IE IT KE LS LU MC MW MZ
NL OA PT SD SE SL SZ TR TZ UG ZM ZW
W: AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH CN CO CR CU CZ DE DK
DM DZ EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR
KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ OM PH PL PT
RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TN TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZM
ZW
EP 1369485 A1 20031210 (200382) EN C12N015-53
R: AL AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LT LU LV MC MK NL PT
RO SE SI TR
AU 2002236250 A1 20020924 (200433) C12N015-53
KR 2004004555 A 20040113 (200434) C12N009-04
ADT WO 2002072839 A1 WO 2002-JP2124 20020307; EP 1369485 A1 EP 2002-702800
20020307, WO 2002-JP2124 20020307; AU 2002236250 A1 AU 2002-236250
20020307; KR 2004004555 A KR 2003-711848 20030909
FDT EP 1369485 A1 Based on WO 2002072839; AU 2002236250 A1 Based on WO
2002072839
PRAI JP 2001-70413 20010313
IC ICM C12N009-04; C12N015-53
ICS C12N001-15; C12N001-19; C12N001-21; C12N005-10; C12Q001-32;
G01N027-327
AB WO 2002072839 A UPAB: 20021204
NOVELTY - Water-soluble pyroquinoline-quinone glucose dehydrogenase (PQQGDH) (I) comprising two subunits combined with each other via a disulfide bond, is new.
DETAILED DESCRIPTION - INDEPENDENT CLAIMS are also included for:
(1) a water-soluble PQQGDH containing a sequence of Pro-Thr-Tyr-Cys-Thr-Thr-Tyr, or Pro-Thr-Cys-Cys-Thr-Tyr, or Thr-Gly-Lys-Asn-Phe-Val-Pro and Ser-Thr-Thr-Tyr-Asn-Asp-Ala;
(2) a gene encoding any of the PQQGDHs;
(3) a vector containing the gene;
(4) a transformant containing the gene;
(5) a glucose assay kit containing any of the PQQGDHs; and
(6) a glucose sensor containing any of the PQQGDHs.
USE - (I) is applicable in glucose sensors (claimed) in determining serum glucose e.g. in diagnosis and management of diabetes.
ADVANTAGE - (I) contains two subunits combined through a disulfide bond, and therefore exhibits improved heat stability.
Dwg.0/7
FS CPI EPI
FA AB; DCN
MC CPI: B04-C01G; B04-E03E; B04-E08; B04-F0100E; B04-L03D; B11-C07; B11-C08E;
B11-C09; B12-K04A; B14-S04; D05-C03B; D05-H09; D05-H12A; D05-H12E;
D05-H14; D05-H17A3
EPI: S03-E03C; S03-E14H5